

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-171290

(P2003-171290A)

(43) 公開日 平成15年6月17日 (2003.6.17)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	データベース (参考)
A 6 1 K 35/64		A 6 1 K 35/64	2 B 0 0 5
A 2 3 K 1/16	3 0 2	A 2 3 K 1/16	3 0 2 B 2 B 1 5 0
	3 0 4		3 0 4 A 4 B 0 1 8
1/18		1/18	A 4 B 0 4 1
A 2 3 L 1/076		A 2 3 L 1/076	4 C 0 8 3
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 17 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-201883(P2002-201883)

(22) 出願日 平成14年7月10日 (2002.7.10)

(31) 優先権主張番号 特願2001-295464(P2001-295464)

(32) 優先日 平成13年9月27日 (2001.9.27)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000155908

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72) 発明者 宮田 聡美

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内

(72) 発明者 牛尾 慎平

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内

(72) 発明者 栗本 雅司

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コラーゲン産生増強剤の製造方法とその用途

(57) 【要約】

【課題】 L-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を増強する作用を持続して発揮する、手段を提供する。

【解決手段】 L-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類を含有するコラーゲン産生増強剤により解決する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 有効成分としてL-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを含んでなるコラーゲン産生増強剤。

【請求項2】 L-アスコルビン酸類及びローヤルゼリー類と共に、飲食品、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフードの分野の何れかにおいて使用される1種又は2種以上の他の成分を含んでなる請求項1に記載のコラーゲン産生増強剤。

【請求項3】 他の成分が、抗酸化剤、増粘剤、糖類、糖アルコール類から選ばれる1種又は2種以上であることを特徴とする請求項2に記載のコラーゲン産生増強剤。

【請求項4】 L-アスコルビン酸類を、L-アスコルビン酸としての重量換算で0.02重量%以上含有することを特徴とする請求項1乃至3の何れかに記載のコラーゲン産生増強剤。

【請求項5】 L-アスコルビン酸類をL-アスコルビン酸としての重量換算したとき、重量換算したL-アスコルビン酸1重量部に対して、ローヤルゼリー類を非加熱処理ローヤルゼリーとしての重量換算で0.5重量部以上含有することを特徴とする請求項1乃至4の何れかに記載のコラーゲン産生増強剤。

【請求項6】 L-アスコルビン酸類がL-アスコルビン酸2-グリコシドであることを特徴とする請求項1乃至請求項5の何れかに記載のコラーゲン産生増強剤。

【請求項7】 L-アスコルビン酸2-グリコシドが、少なくとも、L-アスコルビン酸2-グルコシドを含有することを特徴とする請求項6記載のコラーゲン産生増強剤。

【請求項8】 ローヤルゼリー類が、70℃以上で30分間以上加熱処理されていることを特徴とする請求項1乃至7の何れかに記載のコラーゲン産生増強剤。

【請求項9】 請求項1乃至8の何れかに記載のコラーゲン産生増強剤を含有する組成物。

【請求項10】 飲食品、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフードの何れかであることを特徴とする請求項9記載の組成物。

【請求項11】 L-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを配合する工程を含む請求項1乃至8の何れかに記載のコラーゲン産生増強剤の製造方法。

【請求項12】 ローヤルゼリー類を含有することを特徴とするTGF- $\beta$ 産生増強剤。

【請求項13】 ローヤルゼリー類と共にL-アスコルビン酸類を含有することを特徴とする請求項12記載のTGF- $\beta$ 産生増強剤。

【請求項14】 ローヤルゼリー類を含有することを特徴とするケラチノサイト増殖促進剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なコラーゲン産生増強剤、詳細には、L-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを含んでなるコラーゲン産生増強剤及び当該コラーゲン産生増強剤を含有する組成物に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】L-アスコルビン酸(ビタミンC)は、ヒト、サル、モルモットでは生体内で産生されない必須の栄養素の一つである。L-アスコルビン酸は、壞血病の予防・治療に効果があることが知られているだけでなく、生体内では、結合組織の主成分であるコラーゲン産生、白血球増加による免疫増強作用などの数々の生理作用に関係し、生体の健康維持・増進に重要な役割を担っている。L-アスコルビン酸は、単に、必須栄養素にとどまらず、酸味剤、pH調節剤、酸化防止剤、褐変防止剤などとして飲食品に利用されており、加えて、ウイルス性疾患、細菌性疾患、悪性腫瘍疾患などの各種疾患の予防剤・治療剤、さらには、紫外線吸収剤、メラニン生成抑制剤などの美肌剤、色白剤などの化粧品一般に幅広く用いられている。また、L-アスコルビン酸は、それが直接還元性を示すため、不安定で、酸化分解を受けやすく、容易にその生理活性が減弱するので、L-アスコルビン酸の安定化のために、L-アスコルビン酸グルコシド、L-アスコルビン酸リン酸、L-アスコルビン酸硫酸などのL-アスコルビン酸誘導体が開発されている。しかし、それらはいずれもL-アスコルビン酸を原料に製造されるものであることから、そのコストは、必然的に、L-アスコルビン酸よりも高くならざるを得ない。一方、L-アスコルビン酸及び/又はL-アスコルビン酸誘導体を使用しても、これらを大量に生体へ適用すると、それ自体が強酸性のため、皮膚や口腔内、胃腸内の粘膜に対する一時的な障害性や、L-アスコルビン酸の代謝物が大量に生成すること、さらには、経済的なメリットを考えると、毎日摂取する健康食品などでは、L-アスコルビン酸の使用量を低減させた状態においても、その生理作用が十分に発揮できる組成物が望まれている。

【0003】一方、ローヤルゼリーは、ミツバチの巣における王台(女王バチの房)に蓄積された、働きバチの外分泌腺からの乳白色の分泌物であり、女王バチとなるべき幼虫に与えられる餌である。王台で孵化したミツバチの幼虫は、その時点では働きバチと区別できないものの、ローヤルゼリーを十分に摂取して生育すると、働きバチに比べて体が大きく、寿命が長く、産卵数が多い女王バチに成長する。このことから、ローヤルゼリーには強壮・強精などの諸種の生理作用があると期待され、古来より、健康食品として利用され、実際に、経験的にこれらの作用があることが知られていた。また、近年は、

ローヤルゼリーの抗菌作用、免疫増強作用、抗腫瘍作用、抗炎症作用などに関して数多くの学術報告がなされている。ローヤルゼリーは天然の産物であることから、ヒトをはじめとする動物類へ適用しても、重篤な副作用を招来しないと考えられる。これらのことから、ローヤルゼリーは、健康食品や化粧品原料として広く利用されている。

【0004】上記のとおり、L-アスコルビン酸やローヤルゼリーは、健康食品や化粧品原料として広く使用されており、L-アスコルビン酸とローヤルゼリーを含有する飲食物（特開2000-342331号公報、特開2000-60455号公報）や皮膚外用剤（特開昭63-03706号公報）、さらには、L-アスコルビン酸誘導体とローヤルゼリーを含有する皮膚外用剤（特開2000-63226号公報）などもすでに開発されている。

【0005】しかしながら、これまで、ローヤルゼリーが、コラーゲン産生を増強する点に着目したものはなく、また、ローヤルゼリーがアスコルビン酸によるコラーゲン産生を増強するとの知見を得ているものもない。

【0006】今日、高齢化社会を迎え、世の中の多くの中高年齢者、とりわけ、女性にとって、老化に伴う皮膚の厚みの減少や新陳代謝の低下などの変化は、悩みの種であり、特に、顕著に感じられる、顔面の小ジワ・シワ、しみ、たるみの発生、つやの減少やはりの消失、皮膚の弾力の減少などにもなる容貌の変化は、その代表的なものである。これまでも、皮膚の保湿性を確保するためにコラーゲンや、ヒアルロン酸などのムコ多糖を配合した化粧品が、老化防止用の化粧品として開発されてきたものの、それだけでは、皮膚の老化防止に十分な効果は得られていない。近年、老化に関する研究が進んだことにより、真皮を形成するコラーゲン線維の顕著な減少が、皮膚の老化の主要な原因となっていることが明らかになってきた。そして、顔面の小ジワやシワ、しみやつやの減少、はりの消失、たるみの発生、皮膚の弾力の低下などの容貌の変化の原因が、コラーゲン線維の減少と関係していることが示唆されてきており、皮膚の老化の原因には様々なものがあるものの、結局は、真皮に存在する線維芽細胞のコラーゲン産生能の低下や、線維芽細胞自身の増殖性の低下により、コラーゲンの代謝が低下することに帰結する。さらに、皮膚には真皮より外側に、ケラチノサイトからなる表皮が存在し、このケラチノサイトの機能低下によっても、皮膚表面の角化層が弱体化するため、角化層の更新が遅れるだけでなく、皮膚本来の機能の一つである生体防御能の低下を来し、細菌の感染をはじめとする種々の要因により、真皮の線維芽細胞はもとより、皮膚全体へのダメージが増加するため、皮膚の老化が一層助長される。また、線維芽細胞におけるコラーゲンの産生量の低下は、単に皮膚の老化を進行させるのみでなく、血管をはじめとするコラーゲ

ンによりその構造が維持されている体内の組織、臓器の脆弱化を引き起こし、健康に支障をきたす原因となる。しかしながら、コラーゲンは蛋白質であり、経口摂取や皮膚表面に塗布しただけでは、直接体内に吸収されにくいし、まして、線維芽細胞やケラチノサイトの活性を増強することはできないので、皮膚の老化の根本的な予防・治療とはなり得ない。そこで、皮膚の老化防止や健康の維持・増進などを目的として、真皮や組織・臓器の主要な構成成分であるコラーゲンの産生を持続して増強することが可能で、且つ、安全なコラーゲン産生増強剤、さらには、皮膚を構成する真皮に存在する線維芽細胞や表皮に存在するケラチノサイトそのものの活性化剤の開発が望まれている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】かかる状況に鑑み、本発明の課題は、L-アスコルビン類によるコラーゲン産生を、効果的に増強する手段を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、線維芽細胞を用いて、上記の課題を解決するための検討と検索をかさねた結果、L-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを組み合わせることにより、L-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を、L-アスコルビン酸類単独の使用ではその産生が認められない濃度、或いは、低い産生量しか認められない濃度において、ローヤルゼリー類を添加することにより、その産生が効率的に増強するという予想外の知見に到達した。また、その結果として、L-アスコルビン酸類の失活が進み、もはや単独ではコラーゲン産生が認められない場合であっても、ローヤルゼリー類を存在させることによってL-アスコルビン酸類の活性が増強され、コラーゲン産生が顕現することを独自の知見として見いだした。一方、線維芽細胞のコラーゲン産生は、線維芽細胞などから分泌されるトランスフォーミング グロース ファクター（以下、「TGF- $\beta$ 」と略記する。）により増強されることは知られていた。本発明者らは、この点にも着目してさらに研究を進めた結果、ローヤルゼリー類は線維芽細胞に対してアスコルビン酸類の存在下で、TGF- $\beta$ の産生を増強させ、加えて、真皮よりも皮膚の表面側に存在する表皮のケラチノサイトに対しては、ローヤルゼリー類単独で、TGF- $\beta$ の産生を増強させることを見いだした。このように、ローヤルゼリー類によるL-アスコルビン酸類のコラーゲン産生増強機構の一つが、TGF- $\beta$ の産生の増強によることを確認して、ローヤルゼリー類及び／又はローヤルゼリー類とL-アスコルビン酸類が、コラーゲン産生増強剤、TGF- $\beta$ 産生増強剤及び／又はケラチノサイト増殖促進剤として有用であることを見出し、本発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明は、L-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを含んでなるコラーゲン産生増

強剤とその製造方法ならびに用途を提供することにより上記の課題を解決するものであり、さらに、Ｌ－アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを含んでなるコラーゲン産生増強剤を含有してなる組成物とその製造方法ならびに用途を提供することにより上記課題を解決するものである。

【0010】また、本発明は、ローヤルゼリー類或いはローヤルゼリー類とアスコルビン酸類とを含んでなる TGF- $\beta$  産生増強剤及びケラチノサイト増殖促進剤とその製造方法ならび用途を提供することにより上記課題を解決するものである。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明のコラーゲン産生増強剤は、Ｌ－アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを含んでなる。本発明でいうＬ－アスコルビン酸類とは、Ｌ－アスコルビン酸及び／又はその塩、Ｌ－アスコルビン酸２－グルコシドをはじめとするＬ－アスコルビン酸２－グリコシド、Ｌ－アスコルビン酸リン酸、Ｌ－アスコルビン酸硫酸、DL- $\alpha$ -トコフェロール２－Ｌ－アスコルビン酸リン酸ジエステルやＬ－アスコルビン酸２－グルコシドのアシル化誘導体などのＬ－アスコルビン酸誘導体及び／又はそれらの塩であって、生体内でＬ－アスコルビン酸の生理活性を発揮するものであればよく、それらの化合物の１種又は２種以上を組み合わせた、例えば、組成物、混合物の形態のものであればいずれでも良い。また、本発明でいうＬ－アスコルビン酸類として挙げるＬ－アスコルビン酸の塩とは、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム、アルキルアンモニウムなどの無機塩基及び／又は有機塩基の１種又は２種以上のいずれの組合わせであっても良い。アスコルビン酸類にあって、Ｌ－アスコルビン酸２－グリコシドなどの安定型Ｌ－アスコルビン酸は、皮膚に投与しても、酸化分解を受けることがなく、しかも、生体の酵素により徐々に分解され、徐放性効果を有することから、生体への投与回数を低減することができ、さらに、投与された際には、Ｌ－アスコルビン酸としてのその効果が、Ｌ－アスコルビン酸に比して長期間持続するので、本発明のコラーゲン産生増強剤のＬ－アスコルビン酸類として特に望ましい。

【0012】本明細書では、具体的な実験結果は示さないが、前記アスコルビン酸類は、何れも、人を含む動物が経口的に摂取した場合、或いは、経皮的に投与された場合、何れも、生体内にアスコルビン酸として吸収され、コラーゲン産生作用を示すことが確認された。また、さらには、体内でＬ－アスコルビン酸を合成できる動物用の飼料、餌料、ペットフードなどにあっては、生体内でＬ－アスコルビン酸に変換されるＬ－アスコルビン酸の前駆体であるＬ－グルロノ－ $\gamma$ -ラクトンも、本発明のアスコルビン酸類として使用することができる。

【0013】また、ローヤルゼリーとは、ミツバチの働

きバチにより分泌され、巣の王台に蓄積された、女王バチの幼虫に餌として与えられる乳白色の液状のものである。そして、本発明でいうローヤルゼリー類とは、ローヤルゼリー或いはローヤルゼリーを原料として製造される組成物であって、Ｌ－アスコルビン酸によるコラーゲン産生を増強しうる限り、それが、天然の液状のままであっても、人為的に加工を加えた液状又は、液状以外の固体、粉末、顆粒、ペーストなどの形態のいずれのものであってもよい。ローヤルゼリー類は、分泌するミツバチの種類やその産地に特に限定はない。分泌するミツバチの種としては、セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*)、トウヨウミツバチ (*Apis cerana*)、オオミツバチ (*Apis dorsata*)、コミツバチ (*Apis florea*) などが挙げられる。産地としては、日本、南米、北米、豪州、中国、欧州などが挙げられる。一般に、ローヤルゼリーは、それを使用の対象とする個体によってはアレルギー反応などの悪影響を惹き起こす場合がある。南米、とりわけ、ブラジル産のローヤルゼリーはこのような悪影響が比較的少ないので、本発明の実施に特に有用である。また、特開昭 60-9457 号公報に示されるとおり、生ローヤルゼリー（以下、「非加熱処理ローヤルゼリー」という。）は、加熱によりその成分に変性が生じることから、65℃以上の処理は避けることが一般的である。しかし、本発明で用いる材料としては、70℃以上で30分間以上加熱したローヤルゼリー（以下、「加熱処理ローヤルゼリー」という。）でも、Ｌ－アスコルビン酸によるコラーゲン産生を増強する作用は失活しないので、加熱処理により殺菌処理をしたり、生体にとって好ましくない、例えば、アレルギー性を有する蛋白成分などを変性させてアレルギー性を減少乃至消失させた、加熱処理ローヤルゼリーも有利に利用することができる。さらには、本発明のローヤルゼリー類としては、非加熱処理ローヤルゼリー或いは加熱処理ローヤルゼリーのみでなく、アセトン、エタノール、水などの溶媒抽出、ゲル濾過、その他の方法を使用することにより、当該ローヤルゼリーを部分的に精製した標品であって、Ｌ－アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を増強する作用を有するものであれば、それらも利用することができる。以下、本明細書では、特に断わらない限り、非加熱処理ローヤルゼリーと加熱処理ローヤルゼリーを併せて単に「ローヤルゼリー」という。

【0014】本発明のコラーゲン産生増強剤は、以上のようなＬ－アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを含んでなる。本発明のコラーゲン産生増強剤におけるＬ－アスコルビン酸類とローヤルゼリー類との配合量は、ローヤルゼリー類によりＬ－アスコルビン酸類のコラーゲン産生が増強される必要最少量以上のＬ－アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを含有しているものであればよい。ローヤルゼリー類によるＬ－アスコルビン酸のコラーゲン産生を増強する作用は、例えば、後述する実験

に示すハムスター新生児の線維芽細胞におけるコラーゲン産生量を測定する方法により判定することができる。因みに、本発明のコラーゲン産生増強剤は、その総重量あたりL-アスコルビン酸類をL-アスコルビン酸としての重量換算で0.02重量%以上、望ましくは、0.05重量%以上含み、当該L-アスコルビン酸1重量部に対してローヤルゼリー類をその重量換算で0.5重量部以上、望ましくは、1重量部以上配合してなる。

【0015】本発明のコラーゲン産生増強剤は、抗酸化剤を添加することを妨げない。この場合の抗酸化剤は、本発明のコラーゲン産生増強剤中のアスコルビン酸類の保存中における酸化分解を抑制するものが望ましく、これにより当該コラーゲン産生増強剤のより高いレベルでの安定化を達成することができる。本発明のコラーゲン産生増強剤をヒトを含む動物類のための食用として利用する場合には、抗酸化剤として、食品分野で通常用いられるものから適宜選択できる。具体的には、フラボノイド、ポリフェノール、ビタミンEなどが本発明においては抗酸化剤として有利に利用できる。これらの抗酸化剤の当該コラーゲン産生増強剤における含量は特に制限がないけれども、呈味への影響を考慮して、当該コラーゲン産生増強剤を食用として用いる場合には、これらの抗酸化剤が食品分野で通常用いられる配合割合にしたがうか、或いは、それよりやや減じて用いるのが望ましい。また、本発明のコラーゲン産生増強剤を、化粧品分野、医薬部外品分野、或いは、医薬品分野で使用する場合には、当該分野で各々通常用いられる抗酸化剤を、通常使用される配合割合にしたがうか、或いは、それよりやや減じて用いるのが望ましい。

【0016】また、本発明のコラーゲン産生増強剤には、ブドウ糖、果糖、ラクトース、トレハロース、マルトース、蔗糖、ラクトスクロース、水飴などの糖類、サイクロデキストリンや同じ出願人による国際公開WO 02/10361号公報（発明の名称「 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とその製造方法並びに用途」）に開示された環状四糖などの環状の糖類、エリスリトール、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、マルチトール、還元水飴などの糖アルコール類、アスパルテーム、ステビア抽出物、シュクロース、アセスルファムKなどの高甘味度甘味料、プルラン、カラギーナンなどの多糖類、天然ガム類、合成品のカルボキシメチルセルロースなどの増粘剤などの1種又は2種以上を添加することにより、固状のものにあってはその賦形性に有利に利用できるだけでなく、本発明のコラーゲン産生増強剤の安定化、呈味改善、風味保持などに有利に利用できる。

【0017】本発明のコラーゲン産生増強剤には、ローヤルゼリー類及びL-アスコルビン酸類以外のもの、例えば、特開平10-203952号公報に開示されているブナ科ブナ属の木の芽からの抽出物などのコラーゲン

産生増強作用を持つ成分も、必要に応じて配合することができる。さらに必要に応じて、乳化剤、香料、香辛料、色素、例えば、ビタミンB<sub>1</sub>、ビタミンB<sub>2</sub>、ビタミンB<sub>6</sub>、ビタミンE、ビタミンPあるいはそれらの誘導体などのL-アスコルビン酸類以外のビタミン類や、アミノ酸類などの上記で述べた以外の成分を1種又は2種以上含有させることも有利に実施できる。これらの成分の選択基準は、通常、本発明のコラーゲン産生増強剤の各々の利用分野の必要性に応じて適宜選択される。以上のような成分を含む本発明のコラーゲン産生増強剤の形態には特に制限はなく、粉末、顆粒、錠剤、ペースト、ゼリー、乳液、溶液などの所望の形態で提供される。

【0018】本発明のコラーゲン産生増強剤は、ヒトを含む動物類に、経口的、或いは、経皮的のいずれの経路で投与した場合にも、その有効成分が速やかに生体内に吸収されて、真皮、組織、臓器などに存在する線維芽細胞におけるL-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を持続して増強するので、ヒトを含む動物類が当該コラーゲン産生増強剤を摂取すると、コラーゲンの産生が安定的に持続し、加齢に伴う老化や、紫外線をはじめとする因子によりダメージを受けた皮膚のコラーゲン産生能の低下を回復し、皮膚にはりやうるおいを与え、小ジワ・シワを除去し、皮膚の弾力を回復する効果を奏することができる。また、特に、経皮投与にあっては、L-アスコルビン酸類及びローヤルゼリー類が、真皮に存在する線維芽細胞や表皮に存在するケラチノサイトに速やかに到達し、TGF- $\beta$ の産生を増強するなどして、L-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を持続して増強するとともに、ローヤルゼリーがケラチノサイトの増殖を促進して、その角化層を、強化して生体防御能を増強することから、加齢に伴う老化や、紫外線や有害微生物などをはじめとする因子によりダメージを受けた皮膚のコラーゲン産生能の低下を速やかに回復し、皮膚にはりやうるおいを与え、小ジワ・シワを除去し、皮膚の弾力を回復するのに極めて効果的である。しかも、本発明のコラーゲン産生増強剤は、ヒトを含む動物が簡便に利用できて、健康の維持・増進にも利用でき、例えば、強壮剤、TGF- $\beta$ 産生増強剤、ケラチノサイト増殖促進剤、健康食品、健康補助食品、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフード、雑貨などとしてもとりわけ有用である。

【0019】本発明のコラーゲン産生増強剤の摂取量又は投与量は、対象とするヒトをはじめとする動物やペットなどの種類、年齢、性別などによって異なるものの、L-アスコルビン酸としての重量換算で、体重1kgあたり、通常、0.1mg乃至0.25g、望ましくは、1mg乃至0.5g、ローヤルゼリーとしての重量換算で、体重1kgあたり、通常、0.5mg乃至2g、望ましくは、1mg乃至1g、経口的に、1日1回又は数

回に分けて、効果に応じて、連日又は1日以上の間隔をおいて摂取するか、あるいは投与すればよい。経口的に投与される強壮剤、健康食品、健康補助食品、特別用途食品、保健機能食品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフードなどでは、例えば、液剤、錠剤、粉末剤、顆粒剤、ペースト剤、シラップ剤、カプセル剤など、各々の用途に応じた形態のものを用いることができる。また、本発明のコラーゲン産生増強剤を、化粧品などの皮膚外用剤として皮膚に直接塗布する場合には、当該コラーゲン産生増強剤に使用されるL-アスコルビン酸類或いはローヤルゼリー類は、各々、L-アスコルビン酸或いはローヤルゼリーとしての重量換算で、皮膚外用剤全量中、0.001乃至20重量%、好ましくは、0.005重量%乃至15重量%であり、1日1回又は数回に分けて、効果に応じて、連日又は1日以上の間隔をおいて直接皮膚に塗ればよい。なお、L-アスコルビン酸類或いはローヤルゼリー類は、0.001重量%未満では、その効果は発揮され難くなり、30重量%を越える製品にあっては、製品の物性の面で好ましくない場合がある。また、当該皮膚外用剤は、例えば、ローション、乳液、クリーム、固型、粉末、ゼリー、パック、フェイスマスクなど、その使用目的に応じた形態のものとして用いることができる。

【0020】本発明のコラーゲン産生増強剤は、上記で述べたようにそれ自体で有用である一方、他の成分に配合してなる組成物の形態としても有利に利用できる。本発明のコラーゲン産生増強剤を含有する組成物を製造するには、対象とする動物類やその摂取方法又は投与方法などに応じて選ばれる適宜の組成にしたがって、アスコルビン酸類及びローヤルゼリー類と、以上に示したような飲食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフードの分野の何れかにおいて使用される1種又は2種以上の成分とを、個々の含量に基づいて、目的に応じて混合し、希釈、濃縮、乾燥、濾過、遠心分離などの工程を適宜実施し、L-アスコルビン酸類及びローヤルゼリー類を含有する組成物を調製し、必要に応じて所望の形状に成形すればよい。各成分を配合する順序や、当該工程を実施する時期は、L-アスコルビン酸類及びローヤルゼリー類の品質劣化をきたさない限り、特に制限はなく、例えば、できるだけ新鮮な、又は、採取後低温保存された非加熱処理ローヤルゼリーにL-アスコルビン酸類を混合し、その後、必要に応じて当該工程を適宜実施すればよい。また、アスコルビン酸類は熱に不安定なので、加熱処理ローヤルゼリーを使用する場合には、L-アスコルビン酸類の配合は、非加熱処理ローヤルゼリーを熱処理した後に行うのが好ましい。本発明で用いる、ヒトを含む動物への経口的又は経皮的適用ないしは皮膚外用が許容される成分としては、本発明の組成物の個々の利用分野で通常使用される、例えば、水、アルコール、澱粉質、蛋白質、アミノ酸、繊維質、糖質、

脂質、脂肪酸、ビタミン、ミネラル、着香料、着色料、甘味料、調味料、香辛料、防腐剤、乳化剤、界面活性剤などが挙げられる。本発明による組成物は、例えば、食品分野、飲料分野（動物の飼料、餌料、ペットフードを含む）、特別用途食品類、保健機能食品類、化粧品分野、医薬部外品分野、医薬品分野、雑貨などで有利に利用することができる。

【0021】固状の形態の本発明のコラーゲン産生増強剤は、例えば、L-アスコルビン酸と非加熱処理ローヤルゼリーとを混合し、必要に応じて他の成分を更に混合した後、当該混合物を、減圧乾燥、真空乾燥、温風乾燥などの通常の乾燥工程に供することにより得ることができる。また、例えば、同じ出願人による特開平6-170221号公報に開示される無水 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースなどを賦形剤として利用することにより、通常の乾燥工程を経ることなく固状の形態の当該コラーゲン産生増強剤を得ることもできる。すなわち、結晶又は非結晶の $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース無水物を、L-アスコルビン酸と非加熱処理ローヤルゼリーの混合物に添加し、当該混合物を、常温以下で静置すればよい。 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースの無水物を用いて通常の乾燥工程を経ずに調製されたものは、非加熱処理ローヤルゼリーによるL-アスコルビン酸類のコラーゲン産生を増強する作用はもちろんのこと、非加熱処理ローヤルゼリーが有する様々な作用の安定性がとりわけ優れているので、本発明に有利に利用できる。これら固状の形態の当該コラーゲン産生増強剤は、必要に応じて、粉碎機、造粒機、打錠機などを用いて、粉末、顆粒、錠剤など所望の形態にしたり、さらに必要に応じて、例えば、該粉末又は該顆粒をカプセルに充填して利用することも有利に実施できる。なお、本発明のコラーゲン産生増強剤の粉末化に使用する脱水剤は、ローヤルゼリーの活性を安定に保持しつつ、脱水できる可食性の脱水剤であればいずれでも良く、好ましくは、無水 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースの他に、無水 $\alpha$ 、 $\beta$ -トレハロース、無水マルトース、無水あるいは1含水の環状四糖などが例示される。

【0022】本発明の組成物の形態には特に制限はない。望ましい食品としては、例えば、アイスクリーム、アイスキャンデー、シャーベットなどの氷菓、氷蜜などのシロップ、バタークリーム、カスタードクリーム、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのスプレッド及びペースト、チョコレート、ゼリー、キャンディー、グミゼリー、キャラメル、チューインガム、プリン、シュークリーム、スポンジケーキなどの洋菓子、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖菓などの加工果実ないしは加工野菜、まんじゅう、ういろう、あん、羊羹、水羊羹、カステラ、飴玉、米菓などの和菓子、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなどの調味料などが挙げられる。望ま

しい飲料の形態としては、例えば、合成酒、醸造酒、果実酒、洋酒などの酒類、ジュース、ミネラル飲料、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料、スポーツドリンク、ドリンク剤、緑茶・紅茶・ウーロン茶などの茶飲料、コーヒー、ココアなどの清涼飲料などが挙げられる。望ましい化粧品品の形態としては、例えば、ローション、乳液、クリーム、固型、粉末、ゼリー、パック、フェイスマスクなどの形態の、基礎化粧品、洗浄用化粧品、入浴用化粧品、口腔化粧品、日焼け・日焼け止め化粧品、メイクアップ化粧品、頭髮化粧品（発毛剤、育毛剤など）や、台所用洗剤のように肌に直接影響を及ぼす雑貨類などが挙げられる。以上のような本発明による組成物を製造するには、目的とする製品を慣用の製造方法にしたがって製造する過程の適宜の時期に本発明のコラーゲン産生増強剤を添加するか、あるいは、L-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを個々に、適宜、添加すればよい。添加の時期に特に制限はないけれども、目的とする製品が加熱工程を経て製造されるもの場合には、L-アスコルビン酸類や他の熱に不安定な成分については、加熱工程の後、常温、望ましくは、30℃以下に冷却した後に添加することにより、製造工程でのコラーゲン産生増強作用の減衰を防ぐことができる。以上のような本発明の組成物は、本発明のコラーゲン産生増強剤を、製品重量あたり、通常、0.01重量%乃至20重量%、望ましくは、0.1重量%乃至10重量%含有する。

【0023】なお、本発明において、L-アスコルビン酸類が、L-アスコルビン酸2-グリコシドなどのようなL-アスコルビン酸誘導体である場合には、生体内及び／又は細胞表面等に存在する酵素などの作用により切断され、又、L-アスコルビン酸カリウムなどのL-アスコルビン酸の塩類である場合にはイオンに解離し、摂取又は投与されたL-アスコルビン酸類は、何れもL-アスコルビン酸として真皮や臓器などに存在する線維芽細胞や表皮のケラチノサイトに到達する。そして、L-アスコルビン酸と同時に生体内に吸収されたローヤルゼリー類が、線維芽細胞及び／又はケラチノサイトに作用し、TGF- $\beta$ の産生を増強するなどして、線維芽細胞のL-アスコルビン酸によるコラーゲン産生を増強する作用を示すことにより、当該コラーゲン産生増強作用が持続することを可能ならしめる。したがって、当該コラーゲン産生増強剤を、通常の製品と同様に日常的に利用することにより、利用した生体においてコラーゲン産生の増強作用が効果的に発揮され、L-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を長期間持続するので、ヒトを含む動物類が摂取すると、真皮や他の組織や臓器に分布する線維芽細胞などのコラーゲンの産生が安定的に持続する。さらには、ローヤルゼリー類はケラチノサイトに作用して、そのTGF- $\beta$ の産生を増強すると共に、ケラチノサイトの増殖を促進して皮膚を強化し、その生体防御能を増強する。その結果、加齢に伴う老化や、紫外線

をはじめとする因子によりダメージを受けた皮膚に対して、真皮の線維芽細胞のコラーゲン産生能の低下を回復すると共に、表皮の生体防御能を強化し、皮膚にはりやうるおいを与え、小ジワやシワの改善や発生の予防、弾力を回復し、内臓や血管の組織を強化する効果を奏することができる。また、当該組成物は、L-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類を含有しているので、単に、L-アスコルビン酸類によるコラーゲンの産生を増強する効果を有しているだけでなく、L-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類各々が本来有している生体の全体の抵抗力の増強や、体調不良の改善の早期化、健康な状態の維持効果、肌荒れの改善及びそれに伴う各種皮膚疾患、健康人の肌荒れ、荒れ性などの改善も併せて達成されることはいうまでもない。したがって、本発明の組成物は、皮膚の老化を防止し、シワのない健康な皮膚を維持するために有用であるばかりでなく美容や健康を維持・増進するための食品・飲料、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフードや雑貨などとして極めて有用である。しかも、頭皮を含む皮膚に適用する化粧品として利用する場合にも、上記の作用効果による皮膚疾患の予防ならびに当該疾患に対する治療効果の改善や発育毛などに奏効する。さらに、本発明のコラーゲン産生増強剤及び／又はそれを含有する組成物を化粧品などとして皮膚に直接塗布する場合は、必要に応じて、例えば、同じ出願人による国際公開WO 01/60388号公報（特願2001-80195号）（発明の名称、「イオン導入具」）などに開示されたイオン導入具を用いることによって、皮膚への浸透を促進してもよい。なお、本発明のローヤルゼリー類によるL-アスコルビン酸類のコラーゲン産生を増強する作用は、非加熱処理ローヤルゼリーを70℃以上で30分間以上処理しても保持される安定な特徴を有しているので、その点においては、本発明のコラーゲン産生増強剤を含有せしめた組成物の調製や保存時の安定性について、特に注意を払う必要はない。しかしながら、非加熱処理ローヤルゼリーは、本来、採取されたそのままの状態ではその品質全般が劣化し易く、その大部分の有用な作用が速やかに減衰するという問題があるので、例えば、同じ出願人による特願2000-37200号明細書（発明の名称、「細胞賦活剤」）に開示されているように、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを添加することにより、周囲温度が25℃程度での保存期間中の品質の劣化を抑制でき、また、取扱いが容易な形態の組成物を使用して、本発明のコラーゲン産生増強剤を調製することも有利に利用できる。

【0024】以下、実験及び実施例に基づいてより詳細に本発明を説明する。

【0025】

【実験1】＜L-アスコルビン酸類或いはローヤルゼリー類によるコラーゲン産生作用の検討＞



## ①アスコルビン酸類

アスコルビン酸類としては、L-アスコルビン酸ナトリウム（試薬特級 和光株式会社販売）を使用した。

## ②ローヤルゼリー類

本実験において、ローヤルゼリー類として非加熱処理ローヤルゼリー及び加熱処理ローヤルゼリーを使用した。非加熱処理ローヤルゼリーとしては、未加工のブラジル産ローヤルゼリー（水分67重量%、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存。）を、使用の際に随時常温で解凍し、直後に必要量を小分けして用いた。また、加熱処理ローヤルゼリーは、前記非加熱処理ローヤルゼリーを、口径が18mmのガラス試験管に5gずつ採取し、 $40^{\circ}\text{C}$ 、 $50^{\circ}\text{C}$ 、 $60^{\circ}\text{C}$ 、 $70^{\circ}\text{C}$ 、 $80^{\circ}\text{C}$ 、 $90^{\circ}\text{C}$ の処理の場合は、恒温槽の中で30分間保持し、 $100^{\circ}\text{C}$ の処理の場合は、オイルバス中で30分間保持した。加熱処理後、直ちに、 $30^{\circ}\text{C}$ 以下に冷却して以後の実験に供した。

## ③ハムスター新生児線維芽細胞の調製

常法に従い、ハムスター新生児の背部皮膚を切開し、剥離した皮膚の切片から、線維芽細胞を単離した。以下、その方法を略記する。予め、ディスパーゼ（株式会社合同酒精販売）を、 $0.03\text{mM}$   $\text{Ca}_2^{++}$ を含むイーグルのMEM培地（株式会社日水販売）に、500単位/mlとなるように溶解した培地中に、当該切片を、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置後、表皮と真皮を剥離した。剥離した真皮を、 $0.25\%$ （v/v）となるようにコラゲナーゼ（株式会社天野製薬販売）を溶解したダルベッコのMEM培地（株式会社日水販売、以下「D-MEM」と略記する。）中で、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間保持した。その後、真皮の細片を、同培地中でピペティングすることにより、ハムスター新生児線維芽細胞の単細胞の懸濁液を調製後、遠心分離により、細胞を回収した。回収した細胞をリン酸緩衝食塩水に懸濁し、30分放置後、線維芽細胞を含む上清を遠心分離して当該細胞を回収し、 $10\%$ （v/v）の牛胎児血清（ギブコBRL社販売、以下「FCS」と略記する。）含有D-MEMに再懸濁して、以後のコラーゲン産生量測定用の線維芽細胞として使用した。

## ④L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生の測定

以下の細胞の培養は、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%$ （v/v） $\text{CO}_2$ 濃度のインキュベーター中で行った。前記③で調製したハムスター新生児の線維芽細胞懸濁液3mlを6ウエルのプレートに、 $4 \times 10^5$ 細胞/ウエルとなるように蒔き込み、7日間培養した。 $10\%$ （v/v）のFCSを含有したD-MEMに、L-アスコルビン酸ナトリウムを、L-アスコルビン酸としての重量換算で、各々0.0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解した。同様に、 $10\%$ （v/v）のFCSを含有したD-MEMに、非加熱処理ローヤルゼリー又は加熱処理ローヤルゼリーを、各

々0.0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解した。当該L-アスコルビン酸ナトリウム又はローヤルゼリーを溶解した各々の培地5mlを、当該線維芽細胞の培養上清を除去したウエルに加え、さらに、3日間培養した。その後、各々のウエルの培養上清を、同一のアスコルビン酸、又は、ローヤルゼリー濃度に調製した培地5mlで置換し、3日間培養した後、前記と同一のアスコルビン酸、或いは、ローヤルゼリー濃度の培地1mlと置換し、さらに3時間培養後、D-MEMに溶解した $[2, 3-^3\text{H}]$ プロリン（ $40\text{Ci}/\text{mmol}$ 、アマシャム社販売）を $3\mu\text{Ci}/\text{ウエル}$ となるように添加し、一晩さらに培養した。本実験に使用した培地類（L-アスコルビン酸、或いは、ローヤルゼリー添加のものを含む）は、いずれも、 $0.22\mu\text{m}$ のフィルターで濾過したものを使用した。

## ⑤線維芽細胞の産生したコラーゲンに取り込まれたプロリンの定量

前記④で $[2, 3-^3\text{H}]$ プロリンの存在下で、ハムスター新生児の線維芽細胞を一晩培養した後、常法にしたがって細胞からコラーゲンを抽出し、取り込まれた $[2, 3-^3\text{H}]$ プロリンを定量した。プロリンの定量は、セオ・ジン キム（Seong-Jin Kim）ら、『ダマトロジック サージェリー』（Dermatologic Surgery）、第24巻、第1054-1058頁（1998年）に記載された方法に基づいて行った。以下、その方法を略記すると、前記④で $[2, 3-^3\text{H}]$ プロリンを加えて一晩培養した細胞の上清を除去後の各ウエルに、トリプシン（ギブコBRL社販売）0.3ml/ウエルを添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ で10分間静置し、さらに、0.3mlのD-MEMを添加して、細胞を当該培地に懸濁した。当該細胞懸濁液を、遠心分離して上清を除去して線維芽細胞を回収し、当該細胞に、 $1\text{mg}/\text{ml}$ のペプシン（シグマ社販売）含有1M酢酸0.1mlを添加し、攪拌して混合し、室温で、4時間振盪した。次に、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ のタイプIコラーゲン（株式会社高研販売）含有0.5M酢酸0.8mlを添加し、3,000回転/分、 $4^{\circ}\text{C}$ で5分間遠心分離後、上清を5M塩化ナトリウムで、 $0.15\text{M}$ に調整し、12,000回転/分、 $4^{\circ}\text{C}$ で10分間遠心分離した。上清を5M塩化ナトリウムで、 $0.45\text{M}$ に調整し、3,200回転/分、 $4^{\circ}\text{C}$ で30分間遠心分離後上清を除去した。さらに、沈澱に、 $20\%$ （v/v）エタノール水溶液4mlを添加し、3,200回転/分、 $4^{\circ}\text{C}$ で10分間遠心分離後上清を除去した。最後に、沈澱に、0.5M酢酸を0.25ml添加し、攪拌して、沈澱を懸濁し、その懸濁液を5mlのシンチレーション溶液に懸濁し、液体シンチレーションカウンターで、コラーゲンに取り込まれた $^3\text{H}$ プロリンの量を常法に従って



定量した。実験は、L-アスコルビン酸ナトリウム、ローヤルゼリーの各々濃度について、3ウエルを使用して実験をおこなった。

【0026】その結果を、L-アスコルビン酸の添加量と、ハムスター新生児の線維芽細胞によるコラーゲン産生量の関係を、L-アスコルビン酸を添加しない時のコラーゲン産生量（液体シンチレーションカウンターのカウント値）を100とする相対値により、表1に示す。ハムスター新生児の線維芽細胞は、L-アスコルビン酸ナトリウムを無添加の場合には、コラーゲン産生は低いレベルにあるのに対し、L-アスコルビン酸を添加した場合には、その濃度に依存した、コラーゲン産生量の増\*

\*加が認められ、L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生が確認された。本実験系における、コラーゲン産生のためのL-アスコルビン酸の最少有効量は、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度では、コラーゲン産生量は飽和点に達し、それ以上の濃度においては、コラーゲン産生量に有意な増加は認められなかった。また、具体的なデータは示さないけれど、ローヤルゼリーは非加熱処理、加熱処理の有無にかかわらず単独では、本実験に使用したいずれの濃度であっても、全くコラーゲン産生の増強は認められなかった。

【0027】

【表1】

L-アスコルビン酸濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	相対的なコラーゲン 産生量 *
0.0	100 ± 12
0.1	95 ± 13
0.2	118 ± 26
0.5	210 ± 33 **
1.0	482 ± 89 **
2.0	1497 ± 155 **
5.0	1755 ± 151 **
10.0	2089 ± 160 **
20.0	2456 ± 186 **
50.0	2841 ± 341 **
100.0	2956 ± 500 **
200.0	2863 ± 456 **

\* : 相対値 ± 標準偏差

\*\* : 有意差有り ( $P < 0.05$ )

【0028】

【実験2】<ローヤルゼリー類のL-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生に与える影響の検討④>実験1に用いたコラーゲン産生量の測定系を用いて、ローヤルゼリー類がL-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生に与える影響を調べた。実験1と同様の方法で調製した新生児ハムスターの線維芽細胞を6ウエルのプレートに時々込み7日間培養した。当該ウエルの培養上清を除去後、10% (v/v) のFCSを含有したD-MEMに、L-アスコルビン酸ナトリウムを、L-アスコルビン酸としての重量換算で、最終濃度が各々0.0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解し、さらに、その各々の溶液に非加熱処理ローヤルゼリー或いは加熱処理ローヤルゼリーを各々0.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解した培地を、5ml/ウエルで添加して、実

験1と同様の方法によりコラーゲン産生量を測定した。実験は、各々の濃度について3ウエルを使用した。結果は、各L-アスコルビン酸濃度における、ローヤルゼリー無添加の液体シンチレーションカウンターのカウント値を対照とし、対照と各ローヤルゼリー添加濃度のカウント値に有意差があるかどうかを検定した。有意差検定において、 $P < 0.05$ を「+」、 $0.1 > P > 0.05$ を「±」、 $P > 0.1$ を「-」と表し、「+」をもって、ローヤルゼリーが、L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生を増強したと判断した。なお、L-アスコルビン酸の濃度が $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では、コラーゲン産生量は飽和に達し、今回実験に使用したローヤルゼリーの濃度範囲では、コラーゲン産生量のそれ以上の増強は認められなかった。また、非加熱処理ローヤルゼリーと加熱処理ローヤルゼリーは、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃及び100℃の何れの処理温度でも、L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生を増強する作用に差は認められなかったため、結果は、非加熱

処理ローヤルゼリーの場合であって、L-アスコルビン酸濃度が0乃至20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  までの結果のみを表2として示した。

\*【0029】  
【表2】

\*

		L-アスコルビン酸濃度 (μg/ml)								
		0.0	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0	20.0
濃度 (μg/ml)	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.0	-	-	-	-	-	-	-	±	±
	10.0	-	-	-	±	+	+	+	+	+
	20.0	-	-	±	+	+	+	+	+	+
	50.0	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	100.0	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ローヤルゼリー	200.0	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	500.0	-	-	+	+	+	+	+	+	+

【0030】実験1に示したように、L-アスコルビン酸単独ではその濃度が0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上でないと、コラーゲン産生作用は認められないにもかかわらず、ローヤルゼリーを併用することにより、0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、すでに、コラーゲン産生作用が認められる。実験で使用したローヤルゼリーには、L-アスコルビン酸は含まれていないので、この結果から、ローヤルゼリーは、L-アスコルビン酸以外の成分により、L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生能を増強しており、また、コラーゲン産生作用に必要なL-アスコルビン酸の濃度を、L-アスコルビン酸単独の場合より低くする作用も有していることが確認された。加えて、L-アスコルビン酸が20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の場合、少なくとも、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上のローヤルゼリーを添加すれば、L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生が、ローヤルゼリーにより増強されることが確認された。このことは、アスコルビン酸類が、生体内で分解を受け、単独での使用であれば、そのコラーゲン産生作用を発揮できない、乃至、産生能が低下する濃度となった場合でも、ローヤルゼリーを併用することにより、アスコルビン酸によるコラーゲン産生が増強され、当該コラーゲンの産生能が安定に維持できることを示すものである。

【0031】

【実験3】<ローヤルゼリー類のL-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生に与える影響の検討②>実験2において、L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生の増強の認められた、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のローヤルゼリーの存在下で、L-アスコルビン酸ナトリウムとL-アスコルビン酸2-グルコシドを用いてコラーゲン産生に与える影響を検討した。

#### ① L-アスコルビン酸類

L-アスコルビン酸類として、L-アスコルビン酸ナトリウム（実験1と同一のもの）、及び、L-アスコルビン酸2-グルコシド（株式会社林原生物化学研究所販売）を使用した。

#### ② ローヤルゼリー類

ローヤルゼリーは、実験1で使用したのと同じ非加熱のローヤルゼリーを使用した。

#### ③ L-アスコルビン酸ナトリウム或いはL-アスコルビン酸2-グルコシドによるコラーゲン産生の測定

10% (v/v) のFCSを含有したD-MEM培地に、ローヤルゼリーを200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように溶解し、さらに、その溶液にL-アスコルビン酸2-グルコシドを、L-アスコルビン酸としての重量換算で、各々0.2、0.5、1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように溶解した。対照として、10% (v/v) のFCSを含有したD-MEM培地、及び、ローヤルゼリー無添加の培地にL-アスコルビン酸2-グルコシドを、L-アスコルビン酸としての重量換算で、各々0.2、0.5、1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように溶解した。当該L-アスコルビン酸2-グルコシドとローヤルゼリーを溶解した培地、或いは、対照として調製した各々の培地5mlを、実験1と同様にハムスター新生児線維芽細胞を6ウエルのプレートで7日間培養後、その培養上清を除去したウエルに加えて、さらに7日間培養し、実験1と同一の方法により、コラーゲンの産生量を定量した。陰性の対照として、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のローヤルゼリーと共に、L-アスコルビン酸ナトリウムを、L-アスコルビン酸としての重量換算で、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように溶解した培地を同様に添加して、7日間培養を行った。

【0032】その結果を、ローヤルゼリー存在下及び非存在下でのL-アスコルビン酸2-グルコシドの添加量と、ハムスター新生児線維芽細胞によるコラーゲン産生の関係をL-アスコルビン酸類及びローヤルゼリーの何れも添しない時の線維芽細胞のコラーゲン産生量を100とする相対値により、表3に示す。ハムスター新生児線維芽細胞は、ローヤルゼリー類の添加の有無に係わらず、L-アスコルビン酸2-グルコシドを無添加の場合には、コラーゲンの産生は、実験1の対象と同様に低いレベルであった。また、0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の濃度のアスコルビン酸2-グルコシドを添加した場合には、無添加に比してコラーゲン産生が増強され、さらに、ロー

ヤルゼリー類の添加により、コラーゲンの産生量は増強された。一方、具体的なデータは示さないが、実験1では、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のL-アスコルビン酸を添加して3日間培養し、同一の培地で置換後さらに3日間培養した場合には、コラーゲン産生が認められたのに対して、陰性対照では、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のL-アスコルビン酸を添加した培地で培養したにもかかわらず、3日間培養した後に、同一の培地で置換していなかったために、コラーゲン産生の増強は認められなかった。このことは、培地に溶解したL-アスコルビン酸2-グルコシドが、培地中\*10

Ｌ-アスコルビン酸２-グルコシド濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	ローヤルゼリー添加の有無 ( $200\mu\text{g}/\text{ml}$ )	コラーゲン産生量 *
0.0	無	100±23
	有	134±34
0.2	無	219±31
	有	298±30 **
0.5	無	527±17
	有	1440±70 **
1.0	無	2250±436
	有	3158±318 **

\*: 相対値±標準偏差

\*\* : 同濃度のL-アスコルビン酸2-グルコシド添加区において、ローヤルゼリー無添加に比して有意差あり ( $P < 0.05$ )

#### 【0034】

【実験4】＜ローヤルゼリー及び／又はL-アスコルビン酸2-グルコシドによる線維芽細胞のTGF- $\beta$ 産生に与える影響の検討＞ローヤルゼリー類によるL-アスコルビン酸類のコラーゲン産生の増強の機構の検討のために、線維芽細胞のコラーゲンのmRNAの産生を増強することが報告されているTGF- $\beta$ の産生に対するローヤルゼリー及び／又はL-アスコルビン酸2-グルコシドの影響を、以下の方法で検討した。

##### ① TGF- $\beta$ の測定方法

TGF- $\beta$ は、TGF- $\beta$ 1 Emax Immuno Assay System (プロメガ社販売) にて測定した。

##### ② ローヤルゼリー及び／又はL-アスコルビン酸2-グルコシド存在下での線維芽細胞のTGF- $\beta$ 産生量の測定

TGF- $\beta$ の産生量の測定には、実験1と同様の方法で調製したハムスターの線維芽細胞を、96ウエルマイクロプレート (ベクトン デキンソン社販売) に $1 \times 10^4$ 細胞/ウエルで時き込み、細胞がウエルの底面全体を覆うまで培養した。培養上清を除去後、10% (v/v) のFCSを含有したD-MEM培地のみ、該培地に $200\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解したローヤルゼリーの存在下或いは非存在下で、L-アスコルビン酸2-グルコシドをL-アスコルビン酸としての重量換算で $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解した培地、或いは、ロー

\*で、L-アスコルビン酸に比して極めて安定であり、細胞に存在するグルコシダーゼにより徐々に、L-アスコルビン酸とグルコースに分解されるため、L-アスコルビン酸としての活性が7日間安定に持続したためと考えられ、ローヤルゼリー類とアスコルビン酸類とを組み合わせる際のL-アスコルビン酸2-グルコシドの優位性を示すものである。

【0033】

【表3】

ヤルゼリーのみを $200\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解した各々の培地を $200\mu\text{l}$ /ウエルで添加して、24時間培養し、培養上清中のTGF- $\beta$ 量を測定した。

【0035】ハムスター新生児線維芽細胞は、L-アスコルビン酸2-グルコシド及びローヤルゼリーの非存在下でも、約300ピコグラム (以下、「pg」と略記する。) /mlのTGF- $\beta$ を産生していた。実験の結果は、このL-アスコルビン酸2-グルコシド及びローヤルゼリーの非存在下での線維芽細胞のTGF- $\beta$ 産生量を100とする相対値により、4に示す。線維芽細胞のTGF- $\beta$ 産生量は、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ のローヤルゼリーの添加では変化しなかった。一方、L-アスコルビン酸2-グルコシドをL-アスコルビン酸の重量換算で $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解した培地を添加した場合には、無添加に比してTGF- $\beta$ 産生が増強される傾向にあり、その産生量は、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ のローヤルゼリーの添加により、有意に増強された。このTGF- $\beta$ の産生増強は、実験3に示す、ハムスターの新生児線維芽細胞のL-アスコルビン酸2-グルコシドによるコラーゲン産生のローヤルゼリーによる増強とよく相関しており、L-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生をローヤルゼリー類が増強する機構の一つに、TGF- $\beta$ の産生の増強を介する系が存在することを示している。

【0036】

【表4】

21 L-アスコルビン酸2- グルコシド濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	22 ローヤルゼリー添加の 有無 ( $200\mu\text{g}/\text{ml}$ )	TGF- $\beta$ 産生量*
0.0	無	100 $\pm$ 9
-----	有	98 $\pm$ 9
0.2	無	111 $\pm$ 5
-----	有	132 $\pm$ 12 **

\* : 相対値 $\pm$ 標準偏差\*\* : 同濃度のL-アスコルビン酸2-グルコシド区において、  
ローヤルゼリー無添加に比して有意差あり ( $P < 0.05$ )

## 【0037】

【実験5】＜ローヤルゼリーによるケラチノサイトのTGF- $\beta$ 産生に与える影響の検討＞L-アスコルビン酸類による線維芽細胞のTGF- $\beta$ の産生がローヤルゼリーによって増強されることが確認されたため、線維芽細胞の存在する真皮に隣接する表皮中のケラチノサイトについても、線維芽細胞へ影響を及ぼす可能性があると考えて、そのTGF- $\beta$ の産生に対するローヤルゼリー及び／又はL-アスコルビン酸2-グルコシドの影響を、以下の方法で検討した。

## ①ケラチノサイト培養用培地

ケラチノサイトの培養には、エピライフ (Epilife) 培地 (カスケードバイオロジック インク社、米国: Cascade Biologics Inc., USA) に、0.06mM  $\text{Ca}^{++}$  と増殖添加剤HKG S (最終濃度:  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  ウシインシュリン、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$  ウシトランスフェリン、0.5 $\mu\text{M}$  ハイドロコチゾン、0.2%ウシ脳下垂体抽出物) (カスケード バイオロジック インク社製、米国)、100単位/ml ペニシリン (明治製菓株式会社販売)、及び、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン (明治製菓株式会社販売) を添加したエピライフ+HKG S培地を、ケラチノサイト用基礎培地として使用した。

## ②ハムスター新生児ケラチノサイトの調製

実験1と同様に調製した4日齢ハムスター新生児の背部皮膚片から、表皮を剥離し、ハサミを用いて細切後、遠心分離により、沈澱を回収した。回収した沈澱に、20単位/mlのDNase (シグマ社販売) を添加し、室温で穏やかに3分間攪拌後、標準MEM培地 (株式会社日水販売、以下、「S-MEM」と略記する。) を添加して、更に2分間攪拌後、遠心分離により細胞を回収して、S-MEMに懸濁した。以下の細胞の培養は、37℃、5% (v/v)  $\text{CO}_2$  濃度のインキュベーター中で行った。

③ローヤルゼリーによるTGF- $\beta$ 産生増強の測定

S-MEMに懸濁したケラチノサイトを、遠心分離して細胞を回収し、ケラチノサイト用基礎培地に再懸濁し、タイプIVコラーゲンコート96ウェルマイクロプレート (ベクトン デキンソン社製) に、 $1 \times 10^4$  細胞/ $100\mu\text{l}$ /ウェルで時き込んだ。ケラチノサイトが、

ウェルの底面に付着後、培養液を除去し、あらかじめ、ケラチノサイト用基礎培地に、実験1で使用したものと同一ローヤルゼリーを、 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように溶解した溶液及び、それをケラチノサイト用基礎培地で2倍段階希釈して調製した、ローヤルゼリーを、各々500、250、125、62.5、及び31.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$  含有する試験液で置換した。3日後に試験液を除去し、同一濃度のローヤルゼリーを含有する試験液を添加して、さらに、24時間培養し、その上清中のTGF- $\beta$ 量を、実験4と同様にTGF- $\beta$ 1 Emax ImmunoAssay Systemにより測定した。ケラチノサイトは、L-アスコルビン酸類及びローヤルゼリー無添加の場合、約70pg/mlのTGF- $\beta$ を産生していた。実験の結果は、このL-アスコルビン酸類及びローヤルゼリー無添加場合のTGF- $\beta$ 産生量を100とする相対値により、表5に示す。

## ④ローヤルゼリーによるケラチノサイトの増殖促進の測定

③の実験と同一の条件で同一の期間ケラチノサイトを培養し、その後さらに3日間培養を継続した後、アラマーブルー (alamar blue) (トレック ダイアグノスティック システムズ インク社製: TREK DIAGNOSTIC SYSTEMS INC.) を20 $\mu\text{l}$ /ウェル添加し、37℃で3時間保持した後で、フルオロスキャンII (Fluoroskan II、ラボシステムズ (LabSystems) 社製) を使用して、励起波長544nm、蛍光波長590nmで蛍光強度を測定した。結果は、ローヤルゼリー無添加で培養したケラチノサイト量 (蛍光強度) を100とした相対値により、表6示す。

【0038】ローヤルゼリーは、125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で、その濃度に依存してケラチノサイトのTGF- $\beta$ の産生を増強し、その作用は、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で特に顕著であった。このことは、ローヤルゼリーが線維芽細胞に作用してTGF- $\beta$ の産生を増強するだけでなく、線維芽細胞が存在する真皮に隣接する表皮中のケラチノサイトにも作用して、TGF- $\beta$ の産生を増強し、その結果、両細胞から産生されるTGF- $\beta$ により、線維芽細胞のコラーゲンの産生が増強されることを示しており、本発明のコラーゲン産生増強剤を直接皮膚

に使用した場合にも、ローヤルゼリーが線維芽細胞に到達する前に、表皮のケラチノサイトに作用することから、その効果が有効、且つ、速やかに発揮されることを示している。なお、具体的なデータは示さないが、アスコルビン酸類はケラチノサイトに対して、ローヤルゼリー\*

ローヤルゼリー濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	TGF- $\beta$ 産生量*
0.0	100 $\pm$ 13
31.3	110 $\pm$ 18
62.5	113 $\pm$ 28
125.0	197 $\pm$ 18
250.0	223 $\pm$ 20
500.0	532 $\pm$ 162 **
1000.0	734 $\pm$ 230 **

\*: 相対値 $\pm$ 標準偏差

\*\*: ローヤルゼリー無添加に比して  $P < 0.05$  (有意差有り)

【0040】また、ローヤルゼリーは、62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で、濃度に依存したケラチノサイトの増殖促進作用を示し、250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で特に顕著であった。このことは、ローヤルゼリーが細胞毒性がない乃至低いことを示している。また、本発明のコラーゲン産生\*

\*ーの存在の有無にかかわらず、そのTGF- $\beta$ 産生能や増殖に影響を及ぼさなかった。

【0039】

【表5】

※増強剤は、ケラチノサイトを増殖せよ、皮膚の角化層を増強することにより、皮膚の持つ生体防御能を強化する作用を併せもつことを示している。

【0041】

【表6】

ローヤルゼリー添加量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	ケラチノサイトの増殖量*
0.0	100 $\pm$ 6
31.3	102 $\pm$ 7
62.5	115 $\pm$ 15
125.0	114 $\pm$ 5
250.0	128 $\pm$ 7 **
500.0	138 $\pm$ 3 **
1000.0	149 $\pm$ 10 **

\*: 相対値 $\pm$ 標準偏差

\*\*: ローヤルゼリー無添加に比して  $P < 0.05$  (有意差有り)

【0042】

【実験6】<コラーゲン産生増強剤の安全性試験>本発明のコラーゲン産生増強剤の原材料となるローヤルゼリー類及びL-アスコルビン酸類は、健康食品分野や化粧品分野などに汎用されており、その安全性が高いことはいままでもないが、念のため、本発明のコラーゲン産生増強剤の安全性について、マウスを用いて検討した。実験1で使用したL-アスコルビン酸ナトリウムをL-アスコルビン酸としての重量換算で、その1重量部に対して、同じく実験1で使用した非加熱処理ローヤルゼリー又は熱処理ローヤルゼリー(100℃、30分間加熱)4重量部を混合して調製した標品を、等倍量の脱イオン水で希釈し試験用の標品とした。対照品として、脱イオン水を使用した。5週令のDDYマウスの雄各5匹(平均体重25g、株式会社日本チャールズリバー販売)に、マウスの体重1kgあたり試験標品及び対照品を10g(コラーゲン産生増強剤として5g/kg)となるように経口的に、30日間連続投与し、体重の変化と外

観の観察を行った。試験用の標品は、アスコルビン酸の安定性を考慮して、毎日投与直前に調製した。

【0043】L-アスコルビン酸ナトリウムと非加熱処理ローヤルゼリー或いは加熱処理ローヤルゼリーからなるコラーゲン産生増強剤を経口投与したいずれの群のマウスも、対照群のマウスと同様に体重が増加し、その健康状態も良好であった。従って、本実験結果から、L-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを含有する本発明のコラーゲン産生増強剤の安全性は高いものと判断された。

【0044】以下、本発明を実施例に基づき更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0045】

【実施例1】<コラーゲン産生増強剤>以下の成分を以下の配合で均一に混合して、コラーゲン産生増強剤を調製した。本品を、実験1、実験4及び実験5の方法に準じて、それぞれそれぞれの活性測定用の培地で希釈し、コラ

ーゲン産生、TGF- $\beta$ の産生作用を有すること及びケ\*

Ｌ-アスコルビン酸ナトリウム

実験1で使用する非加熱処理ローヤルゼリー

【0046】本品は、Ｌ-アスコルビン酸によるコラーゲン産生を増強する作用を示し、皮膚にうるおいを与え、皮膚の老化防止に奏効する、簡便に利用できかつ著効を示すコラーゲン産生増強剤である。また、本品は、適度な酸味により良好な呈味を示すので、日常的に利用する健康食品と有用であるばかりでなく、TGF- $\beta$ 産生増強剤或いはケラチノサイト増殖促進剤としても利用できる。本品は、このまま経口的に摂取することも、又、水やその他の飲料などに溶解して摂取することも自由である。さらには、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフード、※

Ｌ-アスコルビン酸2-グルコシド（株式会社林原生物化学研究所販売）

実験1で使用する非加熱処理ローヤルゼリー

含水結晶トレハロース（商品名『トレハ』、株式会社林原商事販売）

なお、本剤は、さらに、必要に応じて、水酸化ナトリウムを加え、その用途に応じたpHに調節しても良い。

【0048】本品は、持続してコラーゲン産生増強作用を示す、簡便に利用できかつ著効を示すコラーゲン産生増強剤である。本品は、まろやかな甘味と適度な酸味により良好な呈味を示すだけでなく、褐変することなく、長期保存安定性に優れていることから、日常的に利用する健康食品として有用である。本品は、ヒトのみならず、家畜、ペットなどの動物のための経口摂取又は経管投与用組成物として、あるいは、魚、エビ、カニなどの養殖動物用にも直接或いは餌に混合するなどして有利に利用できる。

Ｌ-アスコルビン酸ナトリウム

Ｌ-アスコルビン酸

実験1で使用する非加熱処理ローヤルゼリーを70℃で30分間加熱処理した加熱処理ローヤルゼリー

糖転移ルチン（商品名『 $\alpha$ グルチン』、株式会社林原商事販売）

無水結晶マルチトール

【0051】本品は、安定してコラーゲン産生増強作用を示す、簡便に利用できかつ著効を示すコラーゲン産生増強剤である。本品は、コラーゲン産生増強作用を示すので、皮膚組織の正常化と老化防止に優れた効果を有しているだけでなく、まろやかな甘味と適度な酸味により良好な呈味を示すので、日常的に利用する健康食品として有用である。

【0052】

【実施例4】＜アイスクリーム＞生クリーム（油脂含量約46重量％）18重量部、脱脂粉乳7重量部、全乳51重量部、砂糖13重量部、プルラン2重量部、グアガ

※ラチノサイトの増殖促進を有することを確認した。

1. 0重量部

20. 0重量部

※雑貨などに配合して、これらにコラーゲン産生作用、TGF- $\beta$ 産生増強作用及び／又はケラチノサイト増殖促進作用を付与することも自由である。

【0047】

【実施例2】＜健康食品＞以下の成分を以下の配合で均一に混合したのち、このコラーゲン産生増強剤を常温下で一晩減圧乾燥後、粉碎機を用いて、粉末状のコラーゲン産生増強剤を調製した。本品を10％（v/v）のFCSを含むD-MEMで希釈し、実験1に準じて、本品のコラーゲン産生の増強活性を測定し、当該活性が発揮されていることを確認した。

1. 0重量部

10. 0重量部

38. 0重量部

20★【0049】また、このコラーゲン産生増強剤に、1重量％となるようにシヨ糖脂肪酸エステルを添加し、打錠機を用いて1錠あたり約300mgの錠剤に成形した。本品は、持続してコラーゲン産生増強作用を示す、長期間安定な、携帯にも便利で、かつ、経口摂取の容易な、著効を示すコラーゲン産生増強剤である。

【0050】

【実施例3】＜健康食品＞以下の成分を以下の配合で均一に混合後、減圧乾燥してペースト状のコラーゲン産生増強剤を調製した。調製後、当該コラーゲン産生増強剤が安定してコラーゲン産生増強作用を示すことを確認した。

1. 5重量部

1. 0重量部

20. 0重量部

1. 0重量部

1. 5重量部

ム1重量部の混合物を溶解し、70℃で30分間保持して殺菌した後、ホモゲナイザーで乳化分散させ、次いで、3乃至4℃にまで急冷し、これに、実施例2の方法で得たコラーゲン産生増強剤5重量部を加えてさらに混合し、一夜熟成した後、フリーザーで凍結させてアイスクリームを得た。

【0053】本品は、適度な甘味と上品な風味を示すとともに、コラーゲン産生増強作用を示し、皮膚にうるおいを与え、皮膚の老化防止に奏効するアイスクリームである。

【0054】

## 【実施例5】

## &lt;フルーツゼリー&gt;

砂糖	14.0重量部
含水結晶トレハロース	2.0重量部
ゼラチン	2.5重量部
グレープフルーツジュース	32.0重量部
水	43.5重量部

実験1で使用の非加熱処理ローヤルゼリーを70℃で30分間加熱処理した加熱処理ローヤルゼリー

## L-アスコルビン酸

砂糖、トレハロース、ゼラチン、水を加えて、95℃に加熱し溶解後、グレープフルーツジュースを加えて混合し、さらに、80℃で30分殺菌を行った後、L-アスコルビン酸と加熱処理ローヤルゼリーを加えて冷却し、フルーツゼリーを調製した。

【0055】本品は、適度な甘味となめらかなテクスチャーを示すとともに、コラーゲン産生増強作用を示す、皮膚の老化を防止し、美容と健康の維持・増進に奏効するフルーツゼリーである。

## 【0056】

【実施例6】<健康飲料>無水結晶マルトース500重量部、実施例2のコラーゲン産生増強剤100重量部、粉末卵黄190重量部、脱脂粉乳200重量部、塩化ナトリウム4.4重量部、塩化カリウム1.85重量部、硫酸マグネシウム4重量部、チアミン0.01重量部、ビタミンEアセテート0.6重量部及びニコチン酸アミド0.04重量部、糖転移ヘスペリジン（『αGヘスペ\*

## &lt;配合物①&gt;

モノステアリン酸ポリオキシエチレングリセリン	2.0重量部
自己乳化型モノステアリン酸グリセリン	5.0重量部
ベヘニン酸エイコサニル	1.0重量部
流動パラフィン	1.9重量部
トリオクタン酸トリメチロールプロパン	10.0重量部

## &lt;混合物②&gt;

1,3-ブチレングリコール	5.0重量部
乳酸ナトリウム液	10.0重量部
高麗人参エキス	1.5重量部
パラオキシ安息香酸メチル	0.1重量部
ヒアルロン酸ナトリウム	0.1重量部
甘草エキス	0.5重量部
精製水	62.4重量部

## &lt;コラーゲン産生増強剤&gt;

L-アスコルビン酸2-グルコシド（株式会社林原生物化学研究所販売）

	2.0重量部
実験1で使用した非加熱処理ローヤルゼリー	3.0重量部

なお、本クリームは、さらに、必要に応じて、水酸化カリウムを加えて弱アルカリ性のクリームとしてもよい。

【0059】本クリームは、線維芽細胞やケラチノサイトのTGF-β産生を増強するなどの作用により、皮膚

\*リジンP.S.、東洋精糖株式会社販売）0.02重量部からなる配合物を調製した。この配合物25重量部を精製水150重量部に均一に分散・溶解させ、200gずつ褐色ガラス瓶に封入した。

【0057】本品は、コラーゲン産生増強作用を持続させる上に、栄養源が補足されているので、美容や健康などを目的とする健康飲料として有利に利用できる。なお、本品は、ヒトのみならず、家畜、ペットなどの動物のための経口摂取又は経管投与用組成物としても有利に利用できる。

## 【0058】

【実施例7】<皮膚外用クリーム>下記に述べる配合物①に、配合物②を常法に従って添加・混合し、30℃以下にまで冷却した後に、さらに下記に述べるコラーゲン産生増強剤を加え、水酸化カリウムで、pHを弱酸性に調製し、ホモゲナイザーにより乳化して、皮膚外用クリームを製造した。

のコラーゲン産生を増強、持続させるのみでなく、ケラチノサイの増殖を促進するので、皮膚のみずみずしさを保ち、はりやたるみが改善され、小ジワ・シワにも有効で、老化の防止効果に優れ、また、優れた保湿性を示す



ので、基礎化粧品として有用である。

【0060】

【実施例8】＜TGF- $\beta$ 産生増強剤＞以下の成分を以下の配合で均一に混合したのち、このTGF- $\beta$ 産生増強剤を常温で一晩放置後、粉碎機を用いて、粉末状の\*

実験1で使用する非加熱処理ローヤルゼリー

無水結晶マルトース（商品名『ファイントース』、株式会社林原商事販売）

1.0重量部

49.0重量部

【0061】本品は、ケラチノサイトに対して、TGF- $\beta$ の産生増強する作用及びその増殖を促進する作用を示し、その結果、線維芽細胞のコラーゲン産生が増強されることから、皮膚にうるおいを与え、皮膚の老化防止に奏効する、簡便に利用できかつ著効を示すTGF- $\beta$ 産生増強剤である。また、本品は、適度な酸味により良好な呈味を示すので、日常的に利用する健康食品と有用である。本品は、このまま経口的に摂取することも、又、水やその他の飲料などに溶解して摂取することも自由である。さらには、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフード、雑貨などに配合して、これらに、コラーゲン産生増強作用、TGF- $\beta$ 産生増強作用及び／又はケラチノサイト増殖促進作用を付与することも自由である。

【0062】

【発明の効果】以上説明したように、本発明は、L-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類を含んでなるコラー\*

\*TGF- $\beta$ 産生増強剤を調製した。本品を実験5で使用したケラチノサイト培養培地で希釈し、実験5に準じて、本品のTGF- $\beta$ 産生の増強活性及びケラチノサイト増殖促進活性を測定し、当該活性が発揮されていることを確認した。

※ゲン産生増強剤が、ヒトを含む動物に対して、非加熱処理ローヤルゼリー本来の顕著なL-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を増強する作用を示す上に、当該作用の持続性に優れているという全く独自の知見に基づくものである。当該コラーゲン産生増強剤は、重篤な副作用の懸念がない上、TGF- $\beta$ 産生増強作用及びケラチノサイト増殖促進作用を有しているので、ヒトを含む動物類が簡便かつ快適に、皮膚の老化防止、美容と健康の維持・増進のために利用することができる。また、以上のような特長を有する本発明のコラーゲン産生増強剤は、他の成分と配合することにより、食品、飲料、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフード、雑貨などの各種組成物として利用することも有利に実施できる。

【0063】本発明は、斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に多大の貢献をする、誠に意義のある発明である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テマコード(参考)

A 2 3 L 1/30  
1/302  
A 6 1 K 7/00

A 2 3 L 1/30  
1/302  
A 6 1 K 7/00

A 4 C 0 8 6  
4 C 0 8 7

H  
K  
N

31/341  
A 6 1 P 17/00

31/341  
A 6 1 P 17/00

F ターム(参考) 2B005 AA05 AA06  
2B150 AA06 AB03 AB20 DD01 DE13  
4B018 LB01 LB08 MD09 MD25 MD76  
ME14  
4B041 LC10 LD10 LK07 LK19 LK40  
4C083 AA071 AA112 AB052 AC022  
AC122 AC131 AC302 AC342  
AC422 AC482 AD191 AD332  
AD641 AD642 BB47 CC05  
DD31 EE12  
4C086 AA02 BA03 MA02 MA04 MA52  
MA63 NA05 ZA89 ZC61  
4C087 AA02 BB22 MA02 MA52 MA63  
NA05 ZA89 ZC61

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成17年6月16日(2005.6.16)

【公開番号】特開2003-171290(P2003-171290A)

【公開日】平成15年6月17日(2003.6.17)

【出願番号】特願2002-201883(P2002-201883)

【国際特許分類第7版】

A 6 1 K 35/64

A 2 3 K 1/16

A 2 3 K 1/18

A 2 3 L 1/076

A 2 3 L 1/30

A 2 3 L 1/302

A 6 1 K 7/00

A 6 1 K 31/341

A 6 1 P 17/00

【F I】

A 6 1 K 35/64

A 2 3 K 1/16 3 0 2 B

A 2 3 K 1/16 3 0 4 A

A 2 3 K 1/18 A

A 2 3 L 1/076

A 2 3 L 1/30 A

A 2 3 L 1/302

A 6 1 K 7/00 H

A 6 1 K 7/00 K

A 6 1 K 7/00 N

A 6 1 K 31/341

A 6 1 P 17/00

【手続補正書】

【提出日】平成16年9月21日(2004.9.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項2】

Ｌ－アスコルビン酸類及びローヤルゼリー類と共に、飲食品、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフードの分野の何れかにおいて使用される1種又は2種以上の他の成分を含んでなる請求項1に記載のコラーゲン産生増強剤。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項7】

Ｌ－アスコルビン酸２－グリコシドが、少なくとも、Ｌ－アスコルビン酸２－グルコシ

ドを含有することを特徴とする請求項 6 に記載のコラーゲン産生増強剤。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項 1 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 1 0】

飲食品、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフードの何れかであることを特徴とする請求項 9 に記載の組成物。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項 1 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 1 3】

ローヤルゼリー類と共に L-アスコルビン酸類を含有することを特徴とする請求項 1 2 に記載の TGF- $\beta$  産生増強剤。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 8】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、線維芽細胞を用いて、上記の課題を解決するための検討と検索をかさねた結果、L-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを組み合わせることにより、L-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を、L-アスコルビン酸類単独の使用ではその産生が認められない濃度、或いは、低い産生量しか認められない濃度において、ローヤルゼリー類を添加することにより、その産生が効率的に増強するという予想外の知見に到達した。また、その結果として、L-アスコルビン酸類の失活が進み、もはや単独ではコラーゲン産生が認められない場合であっても、ローヤルゼリー類を存在させることによってL-アスコルビン酸類の活性が増強され、コラーゲン産生が顕現することを独自の知見として見いだした。一方、線維芽細胞のコラーゲン産生は、線維芽細胞などから分泌されるトランスフォーミング グロース ファクター（以下、「TGF- $\beta$ 」と略記する。）により増強されることは知られていた。本発明者らは、この点にも着目してさらに研究を進めた結果、ローヤルゼリー類は線維芽細胞に対してアスコルビン酸類の存在下で、TGF- $\beta$ の産生を増強させ、加えて、真皮よりも皮膚の表面側に存在する表皮のケラチノサイトに対しては、ローヤルゼリー類単独で、TGF- $\beta$ の産生を増強させることを見いだした。このように、ローヤルゼリー類によるL-アスコルビン酸類のコラーゲン産生増強機構の一つが、TGF- $\beta$ の産生の増強によることを確認して、ローヤルゼリー類及び／又はローヤルゼリー類とL-アスコルビン酸類が、コラーゲン産生増強剤、TGF- $\beta$ 産生増強剤及び／又はケラチノサイト増殖促進剤として有用であることを見出し、本発明を完成した。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 8】

本発明のコラーゲン産生増強剤は、ヒトを含む動物類に、経口的、或いは、経皮的のい

ずれの経路で投与した場合にも、その有効成分が速やかに生体内に吸収されて、真皮、組織、臓器などに存在する線維芽細胞におけるＬ－アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を持続して増強するので、ヒトを含む動物類が当該コラーゲン産生増強剤を摂取すると、コラーゲンの産生が安定的に持続し、加齢に伴う老化や、紫外線をはじめとする因子によりダメージを受けた皮膚のコラーゲン産生能の低下を回復し、皮膚にはりやうるおいを与え、小ジワ・シワを除去し、皮膚の弾力を回復する効果を奏することができる。また、特に、経皮投与にあっては、Ｌ－アスコルビン酸類及びローヤルゼリー類が、真皮に存在する線維芽細胞や表皮に存在するケラチノサイトに速やかに到達し、 $TGF-\beta$ の産生を増強するなどして、Ｌ－アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を持続して増強するとともに、ローヤルゼリーがケラチノサイトの増殖を促進して、その角化層を、強化して生体防御能を増強することから、加齢に伴う老化や、紫外線や有害微生物などをはじめとする因子によりダメージを受けた皮膚のコラーゲン産生能の低下を速やかに回復し、皮膚にはりやうるおいを与え、小ジワ・シワを除去し、皮膚の弾力を回復するのに極めて効果的である。しかも、本発明のコラーゲン産生増強剤は、ヒトを含む動物が簡便に利用できて、健康の維持・増進にも利用でき、例えば、強壮剤、 $TGF-\beta$ 産生増強剤、ケラチノサイト増殖促進剤、健康食品、健康補助食品、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフード、雑貨などとしてもとりわけ有用である。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

本発明のコラーゲン産生増強剤の摂取量又は投与量は、対象とするヒトをはじめとする動物やペットなどの種類、年齢、性別などによって異なるものの、Ｌ－アスコルビン酸としての重量換算で、体重1kgあたり、通常、0.1mg乃至0.25g、望ましくは、1mg乃至0.5g、ローヤルゼリーとしての重量換算で、体重1kgあたり、通常、0.5mg乃至2g、望ましくは、1mg乃至1g、経口的に、1日1回又は数回に分けて、効果に応じて、連日又は1日以上の間隔をおいて摂取するか、あるいは投与すればよい。経口的に投与される強壮剤、健康食品、健康補助食品、特別用途食品、保健機能食品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフードなどでは、例えば、液剤、錠剤、粉末剤、顆粒剤、ペースト剤、シラップ剤、カプセル剤など、各々の用途に応じた形態のものを用いることができる。また、本発明のコラーゲン産生増強剤を、化粧品などの皮膚外用剤として皮膚に直接塗布する場合には、当該コラーゲン産生増強剤に使用されるＬ－アスコルビン酸類或いはローヤルゼリー類は、各々、Ｌ－アスコルビン酸或いはローヤルゼリーとしての重量換算で、皮膚外用剤全量中、0.001乃至20重量%、好ましくは、0.005重量%乃至15重量%であり、1日1回又は数回に分けて、効果に応じて、連日又は1日以上の間隔をおいて直接皮膚に塗ればよい。なお、Ｌ－アスコルビン酸類或いはローヤルゼリー類は、0.001重量%未満では、その効果は発揮され難くなり、30重量%を越える製品にあっては、製品の物性の面で好ましくない場合がある。また、当該皮膚外用剤は、例えば、ローション、乳液、クリーム、固形、粉末、ゼリー、パック、フェイスマスクなど、その使用目的に応じた形態のものとして用いることができる。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

固形の形態の本発明のコラーゲン産生増強剤は、例えば、Ｌ－アスコルビン酸と非加熱処理ローヤルゼリーとを混合し、必要に応じて他の成分を更に混合した後、当該混合物を

、減圧乾燥、真空乾燥、温風乾燥などの通常の乾燥工程に供することにより得ることができ。また、例えば、同じ出願人による特開平6-170221号公報に開示される無水 $\alpha$ 、 $\alpha$ -アトレハロースなどを賦形剤として利用することにより、通常の乾燥工程を経ることなく固状の形態の当該コラーゲン産生増強剤を得ることもできる。すなわち、結晶又は非結晶の $\alpha$ 、 $\alpha$ -アトレハロース無水物を、L-アスコルビン酸と非加熱処理ローヤルゼリーの混合物に添加し、当該混合物を、常温以下で静置すればよい。 $\alpha$ 、 $\alpha$ -アトレハロースの無水物を用いて通常の乾燥工程を経ずに調製されたものは、非加熱処理ローヤルゼリーによるL-アスコルビン酸類のコラーゲン産生を増強する作用はもちろんのこと、非加熱処理ローヤルゼリーが有する様々な作用の安定性がとりわけ優れているので、本発明に有利に利用できる。これら固状の形態の当該コラーゲン産生増強剤は、必要に応じて、粉碎機、造粒機、打錠機などを用いて、粉末、顆粒、錠剤など所望の形態にしたり、さらに必要に応じて、例えば、該粉末又は該顆粒をカプセルに充填して利用することも有利に実施できる。なお、本発明のコラーゲン産生増強剤の粉末化に使用する脱水剤は、ローヤルゼリーの活性を安定に保持しつつ、脱水できる可食性の脱水剤であればいずれでも良く、好ましくは、無水 $\alpha$ 、 $\alpha$ -アトレハロースの他に、無水 $\alpha$ 、 $\beta$ -アトレハロース、無水マルトース、無水あるいは1含水の環状四糖などが例示される。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

本発明の組成物の形態には特に制限はない。望ましい食品としては、例えば、アイスクリーム、アイスキャンデー、シャーベットなどの氷菓、氷蜜などのシロップ、バタークリーム、カスタードクリーム、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのスプレッド及びペースト、チョコレート、ゼリー、キャンディー、グミゼリー、キャラメル、チューインガム、プリン、シュークリーム、スポンジケーキなどの洋菓子、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖菓などの加工果実ないしは加工野菜、まんじゅう、ういろう、あん、羊羹、水羊羹、カステラ、飴玉、米菓などの和菓子、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなどの調味料などが挙げられる。望ましい飲料の形態としては、例えば、合成酒、醸造酒、果実酒、洋酒などの酒類、ジュース、ミネラル飲料、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料、スポーツドリンク、ドリンク剤、緑茶・紅茶・ウーロン茶などの茶飲料、コーヒー、ココアなどの清涼飲料などが挙げられる。望ましい化粧品の形態としては、例えば、ローション、乳液、クリーム、固形、粉末、ゼリー、パック、フェイスマスクなどの形態の、基礎化粧品、洗浄用化粧品、入浴用化粧品、口腔化粧品、日焼け・日焼け止め化粧品、メイクアップ化粧品、頭髮化粧品（発毛剤、育毛剤など）や、台所用洗剤のように肌に直接影響を及ぼす雑貨類などが挙げられる。以上のような本発明による組成物を製造するには、目的とする製品を慣用の製造方法にしたがって製造する過程の適宜の時期に本発明のコラーゲン産生増強剤を添加するか、あるいは、L-アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを個々に、適宜、添加すればよい。添加の時期に特に制限はないけれども、目的とする製品が加熱工程を経て製造されるものの場合には、L-アスコルビン酸類や他の熱に不安定な成分については、加熱工程の後、常温、望ましくは、30℃以下に冷却した後添加することにより、製造工程でのコラーゲン産生増強作用の減衰を防ぐことができる。以上のような本発明の組成物は、本発明のコラーゲン産生増強剤を、製品重量あたり、通常、0.01重量%乃至20重量%、望ましくは、0.1重量%乃至10重量%含有する。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

【0025】

## 【実験1】

< L-アスコルビン酸類或いはローヤルゼリー類によるコラーゲン産生作用の検討 >

(1) アスコルビン酸類

アスコルビン酸類としては、L-アスコルビン酸ナトリウム（試薬特級 和光株式会社販売）を使用した。

(2) ローヤルゼリー類

本実験において、ローヤルゼリー類として非加熱処理ローヤルゼリー及び加熱処理ローヤルゼリーを使用した。非加熱処理ローヤルゼリーとしては、未加工のブラジル産ローヤルゼリー（水分67重量%、-20℃で保存。）を、使用の際に随時常温で解凍し、直後に必要量を小分けして用いた。また、加熱処理ローヤルゼリーは、前記非加熱処理ローヤルゼリーを、口径が18mmのガラス試験管に5gずつ採取し、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃の処理の場合は、恒温槽の中で30分間保持し、100℃の処理の場合は、オイルバス中で30分間保持した。加熱処理後、直ちに、30℃以下に冷却して以後の実験に供した。

(3) ハムスター新生児線維芽細胞の調製

常法に従い、ハムスター新生児の背部皮膚を切開し、剥離した皮膚の切片から、線維芽細胞を単離した。以下、その方法を略記する。予め、ディスパーゼ（株式会社合同酒精販売）を、0.03mM  $\text{Ca}^{++}$ を含むイーグルのMEM培地（株式会社日水販売）に、500単位/mlとなるように溶解した培地中に、当該切片を、4℃で一晩静置後、表皮と真皮を剥離した。剥離した真皮を、0.25%（v/v）となるようにコラゲナーゼ（株式会社天野製薬販売）を溶解したダルベッコのMEM培地（株式会社日水販売、以下「D-MEM」と略記する。）中で、37℃で1時間保持した。その後、真皮の細片を、同培地中でピペティングすることにより、ハムスター新生児線維芽細胞の単細胞の懸濁液を調製後、遠心分離により、細胞を回収した。回収した細胞をリン酸緩衝食塩水に懸濁し、30分放置後、線維芽細胞を含む上清を遠心分離して当該細胞を回収し、10%（v/v）の牛胎児血清（ギブコBRL社販売、以下「FCS」と略記する。）含有D-MEMに再懸濁して、以後のコラーゲン産生量測定用の線維芽細胞として使用した。

(4) L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生の測定

以下の細胞の培養は、37℃、5%（v/v） $\text{CO}_2$ 濃度のインキュベーター中で行った。前記（3）で調製したハムスター新生児の線維芽細胞懸濁液3mlを6ウエルのプレートに、 $4 \times 10^5$ 細胞/ウエルとなるように蒔き込み、7日間培養した。10%（v/v）のFCSを含有したD-MEMに、L-アスコルビン酸ナトリウムを、L-アスコルビン酸としての重量換算で、各々0.0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解した。同様に、10%（v/v）のFCSを含有したD-MEMに、非加熱処理ローヤルゼリー又は加熱処理ローヤルゼリーを、各々0.0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解した。当該L-アスコルビン酸ナトリウム又はローヤルゼリーを溶解した各々の培地5mlを、当該線維芽細胞の培養上清を除去したウエルに加え、さらに、3日間培養した。その後、各々のウエルの培養上清を、同一のアスコルビン酸、又は、ローヤルゼリー濃度に調製した培地5mlで置換し、3日間培養した後、前記と同一のアスコルビン酸、或いは、ローヤルゼリー濃度の培地1mlと置換し、さらに3時間培養後、D-MEMに溶解した[2, 3- $^3\text{H}$ ]プロリン（40Ci/mmol、アマシャム社販売）を3  $\mu\text{Ci}$ /ウエルとなるように添加し、一晩さらに培養した。本実験に使用した培地類（L-アスコルビン酸、或いは、ローヤルゼリー添加のものを含む）は、いずれも、0.22  $\mu\text{m}$ のフィルターで濾過したものを使用した。

(5) 線維芽細胞の産生したコラーゲンに取り込まれたプロリンの定量



前記(4)で[2, 3-<sup>3</sup>H]プロリンの存在下で、ハムスター新生児の線維芽細胞を一晩培養した後、常法にしたがって細胞からコラーゲンを抽出し、取り込まれた[2, 3-<sup>3</sup>H]プロリンを定量した。プロリンの定量は、セオ・ジン キム(Seong-Jin Kim)ら、『ダーマトロジック サージェリー』(Dermatologic Surgery)、第24巻、第1054-1058頁(1998年)に記載された方法に基づいて行った。以下、その方法を略記すると、前記(4)で[2, 3-<sup>3</sup>H]プロリンを加えて一晩培養した細胞の上清を除去後の各ウェルに、トリプシン(ギブコBRL社販売)0.3ml/ウェルを添加し、37℃で10分間静置し、さらに、0.3mlのD-MEMを添加して、細胞を当該培地に懸濁した。当該細胞懸濁液を、遠心分離して上清を除去して線維芽細胞を回収し、当該細胞に、1mg/mlのペプシン(シグマ社販売)含有1M酢酸0.1mlを添加し、攪拌して混合し、室温で、4時間振盪した。次に、200μg/mlのタイプIコラーゲン(株式会社高研販売)含有0.5M酢酸0.8mlを添加し、3,000回転/分、4℃で5分間遠心分離後、上清を5M塩化ナトリウムで、0.15Mに調整し、12,000回転/分、4℃で10分間遠心分離した。上清を5M塩化ナトリウムで、0.45Mに調整し、3,200回転/分、4℃で30分間遠心分離後上清を除去した。さらに、沈澱に、20%(v/v)エタノール水溶液4mlを添加し、3,200回転/分、4℃で10分間遠心分離後上清を除去した。最後に、沈澱に、0.5M酢酸を0.25ml添加し、攪拌して、沈澱を懸濁し、その懸濁液を5mlのシンチレーション溶液に懸濁し、液体シンチレーションカウンターで、コラーゲンに取り込まれた<sup>3</sup>Hプロリンの量を常法に従って定量した。実験は、L-アスコルビン酸ナトリウム、ローヤルゼリーの各々の濃度について、3ウェルを使用して実験をおこなった。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

実験1に示したように、L-アスコルビン酸単独ではその濃度が0.5μg/ml以上でないと、コラーゲン産生作用は認められないにもかかわらず、ローヤルゼリーを併用することにより、0.2μg/mlの濃度で、すでに、コラーゲン産生作用が認められる。実験で使用したローヤルゼリーには、L-アスコルビン酸は含まれていないので、この結果から、ローヤルゼリーは、L-アスコルビン酸以外の成分により、L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生能を増強しており、また、コラーゲン産生作用に必要なL-アスコルビン酸の濃度を、L-アスコルビン酸単独の場合より低くする作用も有していることが確認された。加えて、L-アスコルビン酸が20.0μg/mlの濃度の場合、少なくとも、10μg/ml以上のローヤルゼリーを添加すれば、L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生が、ローヤルゼリーにより増強されることが確認された。このことは、アスコルビン酸類が、生体内で分解を受け、単独での使用であれば、そのコラーゲン産生作用を発揮できない、乃至、産生能が低下する濃度となった場合でも、ローヤルゼリーを併用することにより、アスコルビン酸によるコラーゲン産生が増強され、当該コラーゲンの産生能が安定に維持できることを示すものである。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

その結果を、ローヤルゼリー存在下及び非存在下でのL-アスコルビン酸2-グルコシドの添加量と、ハムスター新生児線維芽細胞によるコラーゲン産生の関係をL-アスコルビン酸類及びローヤルゼリーの何れも添加しない時の線維芽細胞のコラーゲン産生量を1

00とする相対値により、表3に示す。ハムスター新生児線維芽細胞は、ローヤルゼリー類の添加の有無に係わらず、L-アスコルビン酸2-グルコシドを無添加の場合には、コラーゲンの産生は、実験1の対象と同様に低いレベルであった。また、 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度のアスコルビン酸2-グルコシドを添加した場合には、無添加に比してコラーゲン産生が増強され、さらに、ローヤルゼリー類の添加により、コラーゲンの産生量は増強された。一方、具体的なデータは示さないが、実験1では、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のL-アスコルビン酸を添加して3日間培養し、同一の培地で置換後さらに3日間培養した場合には、コラーゲン産生が認められたのに対して、陰性対照では、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のL-アスコルビン酸を添加した培地で培養したにもかかわらず、3日間培養した後に、同一の培地で置換していなかったために、コラーゲン産生の増強は認められなかった。このことは、培地に溶解したL-アスコルビン酸2-グルコシドが、培地中で、L-アスコルビン酸に比して極めて安定であり、細胞に存在するグルコシダーゼにより徐々に、L-アスコルビン酸とグルコースに分解されるため、L-アスコルビン酸としての活性が7日間安定に持続したためと考えられ、ローヤルゼリー類とアスコルビン酸類とを組み合わせる際のL-アスコルビン酸2-グルコシドの優位性を示すものである。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

ハムスター新生児線維芽細胞は、L-アスコルビン酸2-グルコシド及びローヤルゼリーの非存在下でも、約300ピコグラム（以下、「pg」と略記する。）/mlのTGF- $\beta$ を産生していた。実験の結果は、このL-アスコルビン酸2-グルコシド及びローヤルゼリーの非存在下での線維芽細胞のTGF- $\beta$ 産生量を100とする相対値により、表4に示す。線維芽細胞のTGF- $\beta$ 産生量は、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のローヤルゼリーの添加では変化しなかった。一方、L-アスコルビン酸2-グルコシドをL-アスコルビン酸の重量換算で $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解した培地を添加した場合には、無添加に比してTGF- $\beta$ 産生が増強される傾向にあり、その産生量は、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のローヤルゼリーの添加により、有意に増強された。このTGF- $\beta$ の産生増強は、実験3に示す、ハムスターの新生児線維芽細胞のL-アスコルビン酸2-グルコシドによるコラーゲン産生のローヤルゼリーによる増強とよく相関しており、L-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生をローヤルゼリー類が増強する機構の一つに、TGF- $\beta$ の産生の増強を介する系が存在することを示している。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

【実験5】

<ローヤルゼリーによるケラチノサイトのTGF- $\beta$ 産生に与える影響の検討>

L-アスコルビン酸類による線維芽細胞のTGF- $\beta$ の産生がローヤルゼリーによって増強されることが確認されたため、線維芽細胞の存在する真皮に隣接する表皮中のケラチノサイトについても、線維芽細胞へ影響を及ぼす可能性があると考えて、そのTGF- $\beta$ の産生に対するローヤルゼリー及び／又はL-アスコルビン酸2-グルコシドの影響を、以下の方法で検討した。

(1) ケラチノサイト培養用培地

ケラチノサイトの培養には、エピライフ (Epilife) 培地 (カスケードバイオロジック インク社、米国: Cascade Biologics Inc., USA) に

、0.06 mM  $\text{Ca}^{++}$  と増殖添加剤 HKGS (最終濃度:  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  ウシインシュリン、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  ウシトランスフェリン、0.5  $\mu\text{M}$  ハイドロコチゾン、0.2% ウシ脳下垂体抽出物) (カスケード バイオロジック インク社製、米国)、100 単位/ $\text{ml}$  ペニシリン (明治製菓株式会社販売)、及び、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン (明治製菓株式会社販売) を添加したエプライフ+HKGS 培地を、ケラチノサイト用基礎培地として使用した。

#### (2) ハムスター新生児ケラチノサイトの調製

実験1と同様にして調製した4日齢ハムスター新生児の背部皮膚片から、表皮を剥離し、ハサミを用いて細切後、遠心分離により、沈澱を回収した。回収した沈澱に、20 単位/ $\text{ml}$  の DNase (シグマ社販売) を添加し、室温で穏やかに3分間攪拌後、標準 MEM 培地 (株式会社日水販売、以下、「S-MEM」と略記する。) を添加して、更に2分間攪拌後、遠心分離により細胞を回収して、S-MEM に懸濁した。以下の細胞の培養は、 $37^\circ\text{C}$ 、5% ( $\text{v}/\text{v}$ )  $\text{CO}_2$  濃度のインキュベーター中で行った。

#### (3) ローヤルゼリーによる TGF- $\beta$ 産生増強の測定

S-MEM に懸濁したケラチノサイトを、遠心分離して細胞を回収し、ケラチノサイト用基礎培地に再懸濁し、タイプ IV コラーゲンコート 96 ウエルマイクロプレート (ベクトン デキンソン社製) に、 $1 \times 10^4$  細胞/ $100 \mu\text{l}$  /ウエルで蒔き込んだ。ケラチノサイトが、ウエルの底面に付着後、培養液を除去し、あらかじめ、ケラチノサイト用基礎培地に、実験1で使用したものと同一ローヤルゼリーを、 $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように溶解した溶液及び、それをケラチノサイト用基礎培地で2倍段階希釈して調製した、ローヤルゼリーを、各々 500、250、125、62.5、及び 31.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含有する試験液で置換した。3日後に試験液を除去し、同一濃度のローヤルゼリーを含有する試験液を添加して、さらに、24時間培養し、その上清中の TGF- $\beta$  量を、実験4と同様に TGF- $\beta$  1 Emax ImmunoAssay System により測定した。ケラチノサイトは、L-アスコルビン酸類及びローヤルゼリー無添加の場合、約 70 pg/ $\text{ml}$  の TGF- $\beta$  を産生していた。実験の結果は、この L-アスコルビン酸類及びローヤルゼリー無添加の場合の TGF- $\beta$  産生量を 100 とする相対値により、表5に示す。

#### (4) ローヤルゼリーによるケラチノサイトの増殖促進の測定

(3)の実験と同一の条件で同一の期間ケラチノサイトを培養し、その後さらに3日間培養を継続した後、アラマー ブルー (alamar blue) (トレック ダイアゴノスティック システムズ インク社製: TREK DIAGNOSTIC SYSTEMS INC.) を  $20 \mu\text{l}$  /ウエル添加し、 $37^\circ\text{C}$  で3時間保持した後で、フルオロスキアン II (Fluoroskan II、ラボシステムズ (LabSystems) 社製) を使用して、励起波長 544 nm、蛍光波長 590 nm で蛍光強度を測定した。結果は、ローヤルゼリー無添加で培養したケラチノサイト量 (蛍光強度) を 100 とした相対値により、表6示す。

#### 【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

本品は、L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生を増強する作用を示し、皮膚にうるおいを与え、皮膚の老化防止に奏効する、簡便に利用できかつ著効を示すコラーゲン産生増強剤である。また、本品は、適度な酸味により良好な呈味を示すので、日常的に利用する健康食品と有用であるばかりでなく、TGF- $\beta$  産生増強剤或いはケラチノサイト増殖促進剤としても利用できる。本品は、このまま経口的に摂取することも、又、水やその他の飲料などに溶解して摂取することも自由である。さらには、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフード、雑貨などに配合して、こ

れらにコラーゲン産生作用、TGF- $\beta$ 産生増強作用及び／又はケラチノサイト増殖促進作用を付与することも自由である。